

生後マウス側坐核におけるヘパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1* 遺伝子の発現

松本 怜 (筑波大学 生物学類)

指導教員：榎 正幸 (筑波大学 医学医療系)

## 【背景と目的】

ヘパラン硫酸は細胞表面や細胞外マトリックスに存在する糖鎖で、糖鎖内部の硫酸基を介してさまざまな細胞外シグナル分子と相互作用し、その機能を調節している。ヘパラン硫酸エンドスルファターゼ *Sulf1/2* はヘパラン硫酸の特定の硫酸基を細胞外で脱硫酸化することで、シグナル分子との相互作用を変化させ、細胞外シグナル伝達を調節する。これまでの研究から、*Sulf1/2* が正常な神経回路形成に必要であることが明らかとなっているが (参考文献 1、2)、成獣マウス脳における役割はほとんど分かっていない。

側坐核は解剖学的に大脳基底核に属し、ほとんどがドーパミン D1 受容体、または D2 受容体を発現する中型有棘ニューロンで構成され、報酬、快感、動機付けなどに関与する。また、側坐核は構造的にも機能的にも異なる Core と Shell と呼ばれる 2 つの領域に分けられる。近年、成獣マウスの側坐核 Shell で *Sulf1* が D1、または D2 受容体と共発現していることが明らかとなったが (参考文献 3)、どの時期から *Sulf1* が側坐核で発現するのかは調べられていない。そこで本研究では、マウス側坐核で *Sulf1* 遺伝子がいつから発現し始めるのか、初めから側坐核 Shell でのみ発現するのかを明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

## 1. 使用したマウス

本研究では、*Sulf1* 発現細胞を同定するために *Sulf1* 遺伝子内に  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) をコードする *lacZ* 遺伝子が挿入されたヘテロマウスを使用した。 $\beta$ -gal は核移行シグナルが付加されているため、*Sulf1* 発現細胞の核に局在する。本研究では生後 1、3、5、7、13、31 日齢のヘテロマウスを使用した。

## 2. 灌流固定・切片の作製

生後 1、3、5 日齢マウスは氷上麻酔、生後 7、13、31 日齢マウスはイソフルランを用いた吸入麻酔を実施後、速やかに 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で灌流固定した。30 分ほど静置したのち脳を取り出し 4% PFA/PBS でさらに一晩浸漬固定した。その後、PBS で 3 度洗浄したのち 30% スクロース/PBS に一晩以上浸漬し O.C.T. compound (サクラファインテックジャパン) に包埋した。

クリオスタット (CM1850, CM1860; Leica Biosystems) を用いて 20  $\mu$ m あるいは 50  $\mu$ m 厚の冠状凍結切片を作成した。マウスの遺伝子型は灌流固定時に尻尾を採取し、抽出したゲノムを用いた PCR で判定した。

## 3. 免疫組織化学

切片を 25-80% メタノールで脱水、水和処理した後、抗  $\beta$ -galactosidase 抗体 (1000 倍希釈, 4600-1409, Biogenesis) を一晩室温で反応させた。反応後、PBST (0.1% Tween 20 in PBS) で洗浄し、Alexa Fluor Plus 594 標識抗ヤギ IgG 抗体 (500 倍希釈, A32758, Invitrogen) を 2 時間室温で反応させた後、PBST で

洗浄し、DAPI (0.1  $\mu$ g/ml, 043-18804, Wako) を室温で 10 分反応させ PBS で洗浄した。

50  $\mu$ m 切片は浮遊切片として染色し、MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業) に貼り付け、CC/Mount (K002, Diagnostic BioSystems) で封入した。20  $\mu$ m 切片はスライドガラスに貼り付けて染色し、封入した。蛍光顕微鏡 Axioplan2 (Carl Zeiss)、BZ-8000 (キーエンス) を用いて観察と撮影を行った。

## 【結果】

生後 1 日齢の側坐核では  $\beta$ -gal のシグナルがほとんど見られなかったが、生後 3 日齢の段階で Shell にシグナルが見られ始め、生後 7 日齢にかけて発現細胞が増加することを観察した (図 1)。Core にはほとんど発現細胞は認められなかった。また、生後 7、13、31 日齢の  $\beta$ -gal 発現細胞の分布に変化はなかった。

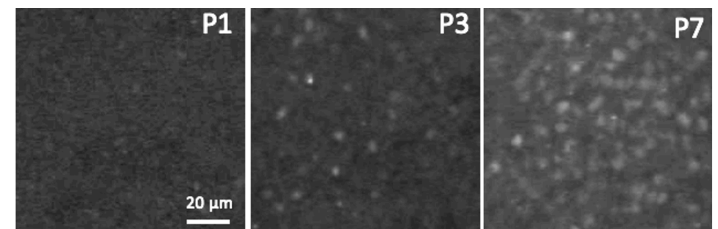


図 1 生後マウス側坐核 Shell の  $\beta$ -gal 染色  
側坐核の内側 Shell 領域での  $\beta$ -gal 染色結果を示した。  
P1、P3、P7 は、生後 1 日、3 日、7 日を示す。

## 【考察】

*Sulf1* が側坐核で発現し始める生後 3~7 日頃はニューロンが生後発達に伴いシナプス形成などを通してより複雑な成獣の神経回路網へと成熟していく時期と考えられる。*Sulf1* はその後成獣でも側坐核で継続的に発現することから、胎児期の神経回路の形成ではなく、成獣における側坐核の機能自体に関連している可能性が考えられる。

## 【参考文献】

- Okada, T. *et al.* (2017). Desulfation of Heparan Sulfate by *Sulf1* and *Sulf2* Is Required for Corticospinal Tract Formation. *Sci Rep* 7:13847.
- Aizawa S *et al.* (2020). Abnormal Pyramidal Decussation and Bilateral Projection of the Corticospinal Tract Axons in Mice Lacking the Heparan Sulfate Endosulfatases, *Sulf1* and *Sulf2*. *Front. Mol. Neurosci.* 12:333.
- Miya, K. *et al.* (2021). Expression of Heparan Sulfate Endosulfatases in the Adult Mouse Brain: Co-expression of *Sulf1* and Dopamine D1/D2 Receptors. *Front. Neuroanat.* 15:726718.